Arnaldoa 18(2): 151 - 158, 2011 ISSN: 1815 - 8242

Efecto del ácido indolacético (AIA) en el desarrollo *in vitro* de segmentos nodales de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze "tara"

Effect of indole acetic acid (IAA) in the *in vitro* development of nodal segments of *Caesalpinia spinosa* (Mol) Kuntze "tara"

Luis Javier Collantes Silva, Judith Georgette Alcalde Mosqueira & Julio Roger Chico Ruiz

Laboratorio de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, PERÚ. lcollantes@ucv.edu.pe

Resumen

Caesalpinia spinosa (Fabaceae) es una especie forestal muy cotizada principalmente por sus taninos y gomas, pero se encuentra amenazada por las deforestaciones indiscriminadas, además presenta una baja capacidad de regeneración, tal situación nos obliga a pensar en el uso de la biotecnología como una alternativa eficiente para generar un sistema de multiplicación y regeneración por vía asexual *in vitro*. Como una alternativa, se planteó evaluar el efecto del ácido indolacético (AIA) en el desarrollo *in vitro* de segmentos nodales de *C. spinosa* (Molina) Kuntze "tara". Se aislaron y cultivaron segmentos nodales jóvenes en medio MS suplementado con sacarosa al 3%, fitagel al 0,25% y ajustándose a un pH de 5,5. Se realizaron tres tratamientos a concentraciones de 0.0 ppm, 0.5 ppm y 1 ppm de AIA. Se avaluaron la altura alcanzada y el número de hojas. Los resultados mostraron una mayor respuesta a concentraciones de 0.5 ppm de AIA a los 45 días de siembra.

Palabras clave: *Caesalipinia spinosa*, AIA (Ácido indolacético), propagación in vitro.

Abstract

Caesalpinia spinosa (Fabaceae) is an highly valued tree forest species mainly by its tannins and gums. However it is threatened by the indiscriminate deforestation, and has a low regeneration capacity, this situation forces us to think of the use of the biotechnology as an alternative efficient to generate a multiplication and regeneration system in vitro culture via asexual. As an alternative to evaluate the effect of the indole acetic acid (IAA) in the development in vitro of nodal segments of C. *spinosa* (Molina) Kuntze "tara". The young nodal segments were isolated and cultured on MS supplemented with 3% sucrose, 0.25% fitagel and pH 5,5. They were carried out three treatments to concentrations of 0.0 ppm, 0.5 ppm and 1 ppm of IAA. The height and the number of leaves were sized. To the 45 days of planting showed response at concentration 0.5 ppm of IAA.

Key words: *Caesalpinia spinosa,* indole acetic acid (IAA), propagation *in vitro*.

Introducción

Caesalpinia spinosa "tara" (Fabaceae), está ampliamente distribuida en América Latina, y en el Perú es una especie nativa. Es un arbusto robusto o árbol pequeño con la corteza espinosa gris, ramas delgadas y densamente frondosas. Presenta pinnas en 2-3 pares, con 8 pares de foliolos subsésiles y semillas rollizas, marrones oscuras. Es endémica de las lomas costeras o boscosas de los Departamentos de Amazonas, Ancash, Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Huánuco, Huancavelica, Ica, Junín, Lima, Madre de Dios, Piura y Tacna, ubicada entre los 0-3000 m. de altura (Ugent & Ochoa, 2006; De la Cruz, 2004).

La "tara" se encuentra al estado silvestre y poseen un inmenso potencial médico, alimenticio e industrial, siendo de gran utilidad para la producción de hidrocoloides o gomas, taninos y ácido gálico, entre otros. Además, es utilizada en la protección de suelos, especialmente cuando no se dispone de agua de riego, a fin de dar buena protección a muchas tierras que hoy están en proceso de erosión y con fines comerciales. El aprovechamiento de los frutos permite obtener numerosos productos de interés. La vaina representa el 62% del peso de los frutos y es la que precisamente posee la mayor concentración de taninos, que oscila entre 30 y 60%. Otro elemento

que se obtiene de los taninos, es el ácido gálico, que es utilizado como antioxidante en la industria del aceite, en la industria cervecera como un elemento blanqueante o decolorante, en fotografía, en curtiembre, manufactura del papel, en productos de farmacia y otros relacionados al grabado y litografía; las semillas, de uso forrajero, tienen en su composición porcentual en peso el 40% de cáscara, 27% de gomas, 26.5% de germen (almendra) con altísimo contenido de proteínas de gran concentración de metionina y triptófano de buena calidad; grasa y aceites que podrían servir para el consumo humano y 7.5% de humedad. De esta parte del fruto, se obtienen aceites, goma (usada para dar consistencia a los helados), harina proteica y derivados como: jabones, pinturas, barnices, esmaltes, tintes de imprenta, mantecas y margarinas comestibles, pues presenta un contenido de ácidos libres de 1,4% (ácido oleico) comercialmente aceptable por su baja acidez (De la Cruz, 2004; FAO, 1995).

Aunque *C. spinosa* se encuentre distribuida en la mayor parte de la Costa del Perú y en ciertas localidades de la Sierra, la sobreexplotación de este recurso, puede llegar a ocasionar consecuencias graves como la extinción de esta especie, tal situación nos obliga a pensar en el uso de la biotecnología como una alternativa eficiente para generar un sistema de multiplicación y regeneración de explantes a través del cultivo de segmentos nodales *in vitro*.

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es una técnica de reproducción en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo. A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, esta poderosa herramienta permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo; así como, el manejo de las mismas en espacios reducidos. Por otro lado, la técnica es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos; plantas homocigotas, en la producción de plantas en peligro de extinción, en estudios de ingeniería genética, etc. (Aceves, 2001; Pierik, 1990)

Una de las porciones de planta de las muchas que pueden servir como explante son los segmentos nodales, estos corresponden a porciones de tallo o microestacas que contienen al menos una yema axilar. La yema axilar en condiciones de cultivo dará origen por división celular a un incremento en el tamaño del tejido y una posterior diferenciación en vástago (tallo y hojas) y raíces. A partir de un tallo *in vitro* se puede disectar varias microestacas que darán origen a plantas completas (Aceves, 2001) .

El cultivo de segmentos nodales del tallo permite la multiplicación rápida de plantas fácilmente aclimatables y la conservación *in vitro* de diferentes variedades por tiempo indefinido, en un espacio limitado con menor exposición a los desastres naturales y de fácil multiplicación cuando se requiera. (Albarrán, *et al.*, 2003)

Se conoce que un gran número de especies en las cuales se puede fomentar la proliferación aleatoria de explantes, mediante la adición de una o varias citocininas y auxinas al medio básico; en consecuencia se puede inducir la formación de brotes y raíces ajustando las concentraciones de auxinas y citocininas (Bhojwani, 1983).

Una auxina muy conocida es el AIA, la cual es la mas importante, radicando su importancia en procesos como la división celular del cambium, diferenciación vascular, formación de raíces adventicias, dominancia apical y desarrollo de frutos. En general, la acción de las auxinas no es aislada y otras hormonas como el etileno, giberelinas y citoquininas también influyen, la respuesta a nivel celular, alargamiento o elongación de las células lo que ha permitido proponer la hipótesis del crecimiento por acidificación. Los usos de las auxinas en la esfera agrícola son muy diversos y se aplican de forma rutinaria en biofábricas, en los cultivos *in vitro* de material vegetal y en las plantaciones (Patten & Glick 1996; Bieto & Talon, 2000; Soberón, *et al.*, 2005).

Aun no existe información necesaria relacionada a la propagación "*in vitro*" de tara, pero si existen trabajos realizados en especies leñosas teniendo gran éxito en su aplicación. Esto motiva a utilizar la biotecnología con el fin de propagar asexualmente la tara "*in vitro*"

logrando así sistemas de multiplicación masiva que produzcan plántulas que puedan ser utilizadas en planes de reforestación. De esta manera, se podría cubrir en el futuro la demanda internacional de esta especie, disminuyendo la depredación indiscriminada de esta planta. Los objetivos del presente trabajo de investigación son propagar asexualmente *C. spinosa*, a partir de segmentos nodales y conocer la concentración mas eficiente de AIA para su regeneración.

Material y métodos

Se obtuvieron semillas de las vainas maduras de árboles de taya, la selección se realizó de acuerdo al tamaño, color e integridad física. Para estimular la germinación de semillas, teniendo en cuenta las características de sus cubiertas, se realizó pruebas de escarificación física y química. Las plántulas obtenidas fueron de 30 días de edad, teniendo en cuenta que éstas presenten de 3-4 nudos, con la finalidad de mantener la homogeneidad de la muestra (Fig 1a), de estas plántulas jóvenes se obtuvieron segmentos nodales (explantos) entre 1 y 1.5 cm de longitud (Fig. 1b). La experiencia se desarrolló en el laboratorio de Fisiología y Cultivos de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de Trujillo.

Preparacion de medio de cultivo

El medio nutritivo basal fue el de Murashige y Skoog (1962) (MS) a la mitad de concentración, suplementado con vitaminas, sacarosa (3%), fitohormona (AIA) en 3 diferentes concentraciones y fitagel (0.3%), ajustándose

Fig. 1. **A**: Plántulas de *C. spinosa* de 30 días de edad. **B**: Obtención de segmentos nodales de plántulas jóvenes de *C. spinosa*

el pH a 5,5; todos los componentes fueron mezclados y llevados a baño María para su homogenización.

El medio preparado se dispersó en frascos de vidrio en volumen de 2 ml, los que fueron sellados con papel aluminio y posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C a 1 atm de presión durante 15 minutos.

Tratamientos

Los diferentes tratamientos tuvieron las siguientes concentraciones de AIA en ppm: El Tratamiento 1 (T1), tuvo 0.0 ppm de AIA; el Tratamiento 2 (T2), tuvo 0.5 ppm de AIA y el Tratamiento 3 (T3), tuvo 1.0 ppm de AIA. Por cada tratamiento se hizo 40 repeticiones. Los explantes fueron expuestos a estos tratamientos15, 30 y 45 días.

Introduccion del explante

Una vez obtenidos los explantes se procedió a sembrar, se realizó el sembrado en una cámara aséptica, los frascos fueron rotulados indicando tratamiento y fecha de siembra; luego se llevaron a la sala de incubación con luz blanca, proporcionado por tres fluorescentes de 40 watts cada uno, fotoperíodo de 16:8 y temperatura promedio de 23°C. Las evaluaciones se realizaron cada 15 días.

Evaluación

La evaluación se realizó a los 15, 30 y 45 días y se anotaron los siguientes datos: altura de planta y número de hojas las cuales fueron sometidas a análisis estadísticos: promedio, desviación estándar y análisis de varianza con un nivel de significancia del 0,05.

Resultados

El desarrollo con respecto al número de hojas en las plántulas cultivadas *in vitro* frente a los tratamientos impuestos en el medio de cultivo, se encontró diferencias significativas entre ellos (ANAVA, p<0,005), mostrándose mayores promedios de numero de hojas en T2, y menor promedio en T3 (Tabla 1).

Tabla 1. Número de hojas promedio de *C. spinosa* obtenidos a partir de segmentos nodales a los 15, 30 y 45 días y a diferentes concentraciones de AIA.

Tratamiento		Número de hojas			Significancia
	[ ] AIA	15 D	30 D	45 D	
T1	0,0	2.36 ± 0.82	6.88 ± 0.91	15.16 ± 0.87	*
T2	0,5	2.26 ± 0.74	8.78 ± 0.81	17.16 ± 1.20	*
T3	1,0	2.00 ± 0.75	2.67 ± 0.86	5.83 ± 0.94	*

P< 0.005

En la Figura 3 observamos que a concentraciones de 0.5 ppm de AIA (T2) para el número de hojas por plántula de *C. spinosa* se presentan los promedios más altos a los 45 días de edad y a concentraciones de 1 ppm de AIA (T3) presentaron promedios mas bajos.

El desarrollo de la longitud en las plántulas cultivadas *in vitro* frente a los tratamientos impuestos en el medio de cultivo, se encontró diferencias significativas entre ellos (ANAVA, p<0,005), mostrándose mayores promedios de longitud de plántula en T2, y menor promedio en T3 (Tabla 2).

Tabla 2. Altura de planta promedio (cm) de *C. spinosa* obtenidos a partir de segmentos nodales a los 15, 30 y 45 días y a diferentes concentraciones de AIA.

Tratamiento		Altura de planta (cm)			Significancia
	[ ] AIA	15 D	30 D	45 D	
T1	0,0	0.13 ± 0.12	1.12 ± 0.18	1.67 ± 0.26	*
T2	0,5	0.12 ± 0.22	1.39 ± 0.20	1.93 ± 0.17	*
T3	1,0	0.10 ± 0.03	0.25 ± 0.08	0.41 ± 0.05	*

P< 0.005

En la Figura 4 observamos que a concentraciones de 0.5 ppm de AIA (T2) para la altura de plántulas de *C. spinosa* se presentan los promedios más altos a los 45 días de edad y a concentraciones de 1 ppm de AIA (T3) presentaron promedios mas bajos.

El mejor tratamiento para la formación de número de hojas y longitud de plántula, es el T2. (Fig. 5)

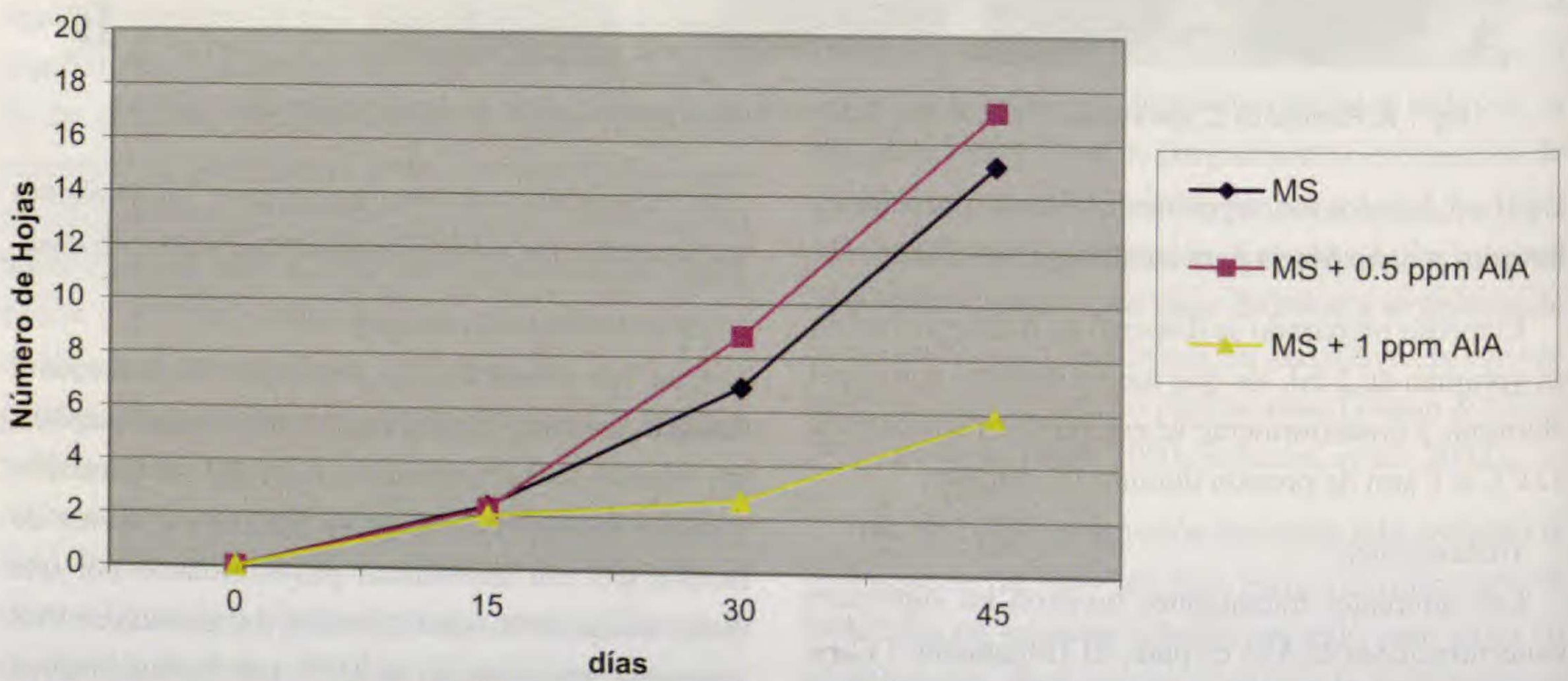

Fig.3. Número de hojas de *C. spinosa* a los 45 días de edad sometidos a diferentes concentraciones de AIA

Discusión

En la actualidad, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas y más recientemente en especies leñosas (Roca & Mrogrinski, 1993). El mejor material vegetal de partida en especies leñosas suelen ser los segmentos nodales de brotes en crecimiento vigoroso (Brand, 1993), por lo que, se consideró utilizar segmentos nodales como explanto. Margara (1988) ha propagado clones por cultivo *in vitro* utilizando segmentos nodales, los cuales permiten que el brote se desarrolle a partir de las yemas, originando una organogénesis directa.

Los segmentos nodales han sido señalados como los explantes más recomendables para la propagación masiva de plantas (Khattak *et al.*, 1990; Fitchet, 1990). Sin embargo, Viloria (1993) y Rodríguez (1996) señalan problemas de contaminación, oscurecimiento y fenolizacion utilizando segmentos nodales en plantas leñosas; por lo que, discrepamos ya que hubo desarrollo del explanto; la contaminación y oscurecimiento fue mínimo, además no hubo problemas de fenolizacion, aunque esto depende de una adecuada desinfección del explanto, así como también el estado fisiológico de la planta de donde se obtuvo el explanto.

Los explantes jóvenes de *C. spinosa* son ideales para los diferentes tratamientos en los que son inducidos, esto concuerda con quien propone que los explantes adultos poseen menos rango de multiplicación celular respecto a los juveniles en plántulas de *Corylus avellana* (Messeguer & Melé, 1987)

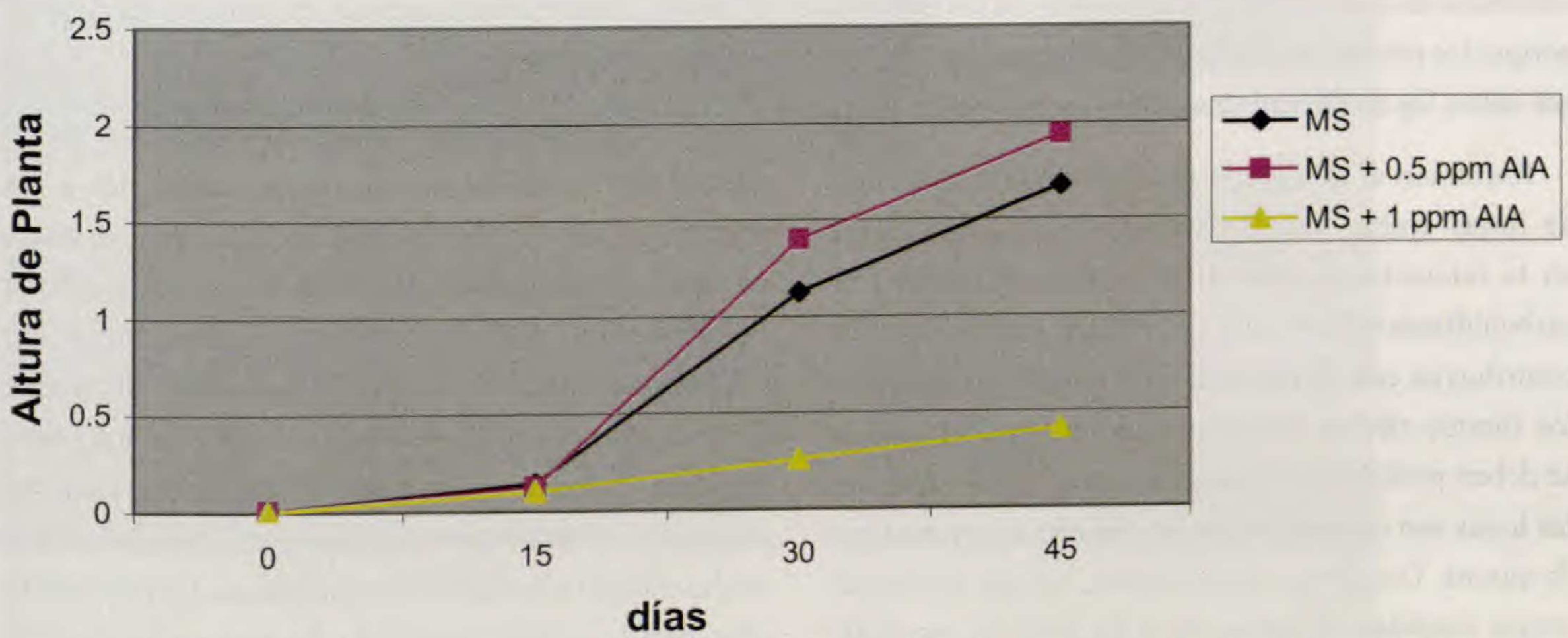

Fig. 4. Altura de plantas emergentes de *C. spinosa* a los 45 días de edad, sometidos a diferentes concentraciones de AIA.

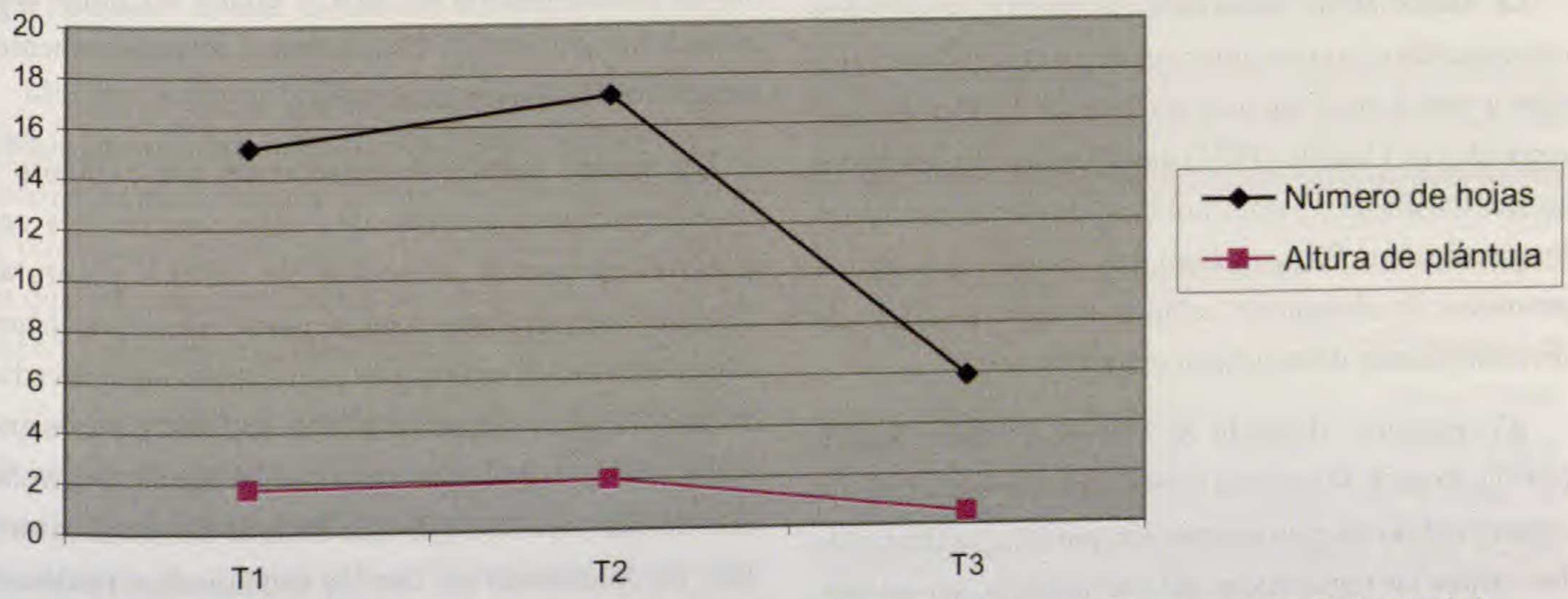

Fig. 5. Numero de hojas vs altura de plántula (cm) de *C. spinosa* expuestas a los diferentes tratamientos, a los 45 días de edad.

Según Calderón *et al.* (1993), a medida que aumentan los días de cultivo aumenta la aparición de hojas. Igualmente, en estudios realizados en avellano chileno, Mardones (1999) concluyó, que el número de verticilos se incrementa a medida que se aumenta el tiempo de permanencia de los microtallos en la cámara de cultivo. Lo cual concuerda con nuestro trabajo, ya que conforme avanzaron los días, existió mayor aparición de hojas a los 45 días de edad (Tabla 1, y Fig. 3).

De la Fig. 3 se desprende que el desarrollo de hojas alcanza su valor más alto en el tratamiento 2 (Fig. 6), aunque en el tratamiento 1 también existió desarrollo significativo de hojas (Fig. 7), siendo poco efectivo el tratamientos 1 (Fig. 8). La baja cantidad de hojas generadas en T3 (1 ppm AIA) se puede atribuir a la baja síntesis de citoquininas propias de la planta, indicando la existencia de una alta síntesis de auxinas en los tejidos o porque los niveles endógenos de auxinas se encuentran por sobre los de citoquininas (Mardones, 1999).

Hartmann *et al.* (1993) indicaron que la presencia de hojas ejerce una fuerte influencia estimulante en la iniciación de las raíces, y esto es porque los carbohidratos translocados de las hojas indudablemente contribuyen con la formación de raíces, sin embargo, los fuertes efectos promotores de raíces de las hojas se deben probablemente a otros factores más directos, las hojas son conocidas por ser poderosas productoras de auxina. Con lo que discrepamos, ya que existiendo mayor cantidad de hojas en el T2 (Fig. 6), no logró influenciar a la formación de raíces.

La mayor altura alcanzada en nuestros resultados corresponde a la concentración de auxina (AIA) a 0.5 ppm y menor en el tratamiento 3 (tabla 2 y Fig. 4), este coincide con Castillo (1973) quien utilizó auxina AIA a concentración de 0.3 ppm y obtuvo un mayor desarrollo longitudinal en *Pinus radiata*, por lo que, esta auxina promueve la elongación celular en base al grado de división celular desarrollado en el vegetal.

Al respecto, Hurtado & Merino (1994); Bartel (1997); Roca & Mroginski (1991), señalan que existe un control regido en gran proporción por los gradientes de las sustancias reguladoras del crecimiento, así mismo, el factor tiempo influye significativamente para que los explantes produzcan nuevas y visibles características morfogénicas, tal es así, que se mostró diferencias en los 3 tratamientos, dando mayores resultados en T2, (Fig.4 y Fig. 6), esto, se debería a la acción conjunta del tiempo de exposición y dosificación de la auxina AIA, y a la vez, por la capacidad de absorción de los tejidos por difusión , ya que se ha demostrado que la captación de la auxina por el tejido vegetal tiene lugar a velocidades suficientemente altas.

Salisbury & Ross (1978) indicaron, que el papel primario de las auxinas en la iniciación de las raíces parece ser una estimulación de las divisiones celulares, la cual es consistente con la promoción de auxinas de la actividad cambial. Cabe destacar, que al agregar auxinas (en este caso AIA) al medio, no hubo formación de raíces, pero hubo desarrollo en número de hojas y longitud del tallo.

Los reguladores del crecimiento, actúan como estimuladores del mismo en pocas cantidades y las concentraciones excesivas deprimen las plantas, o sea, actúan como inhibidores (Pierik, 1990), lo que confirma Tacoronte *et al.* (2004) donde existió mejor inducción y formación de brotes en aquellos medios sin auxina o con bajas concentraciones de las mismas; así como también, Severin *et al.* (2005) donde los mejores resultados se obtuvieron con segmentos nodales y en el medio diluido a la mitad sin reguladores de crecimiento obteniendo como resultado la mayor brotación. Concordamos con estos autores, ya que, en donde hubo menor concentracion de AIA y donde no hubo esta auxina, tratamiento 2 y tratamiento 1 respectivamente, alcanzaron un mayor desarrollo (Fig. 5).

Un tiempo mayor de exposición del explante a concentraciones hormonales altas, no resulta ser beneficioso por la presencia de callo o plántulas deformes esto se puede explicar por el efecto tóxico que se presenta en los tejidos por concentraciones elevadas de las hormonas (Hurtado & Merino, 1987), por lo que a concentración de 1 ppm de AIA hubo menor desarrollo a los 45 días, debido a que esta dosis de hormona es muy alto, no ocurriendo así con los tratamientos restantes. (ver Fig. 5).

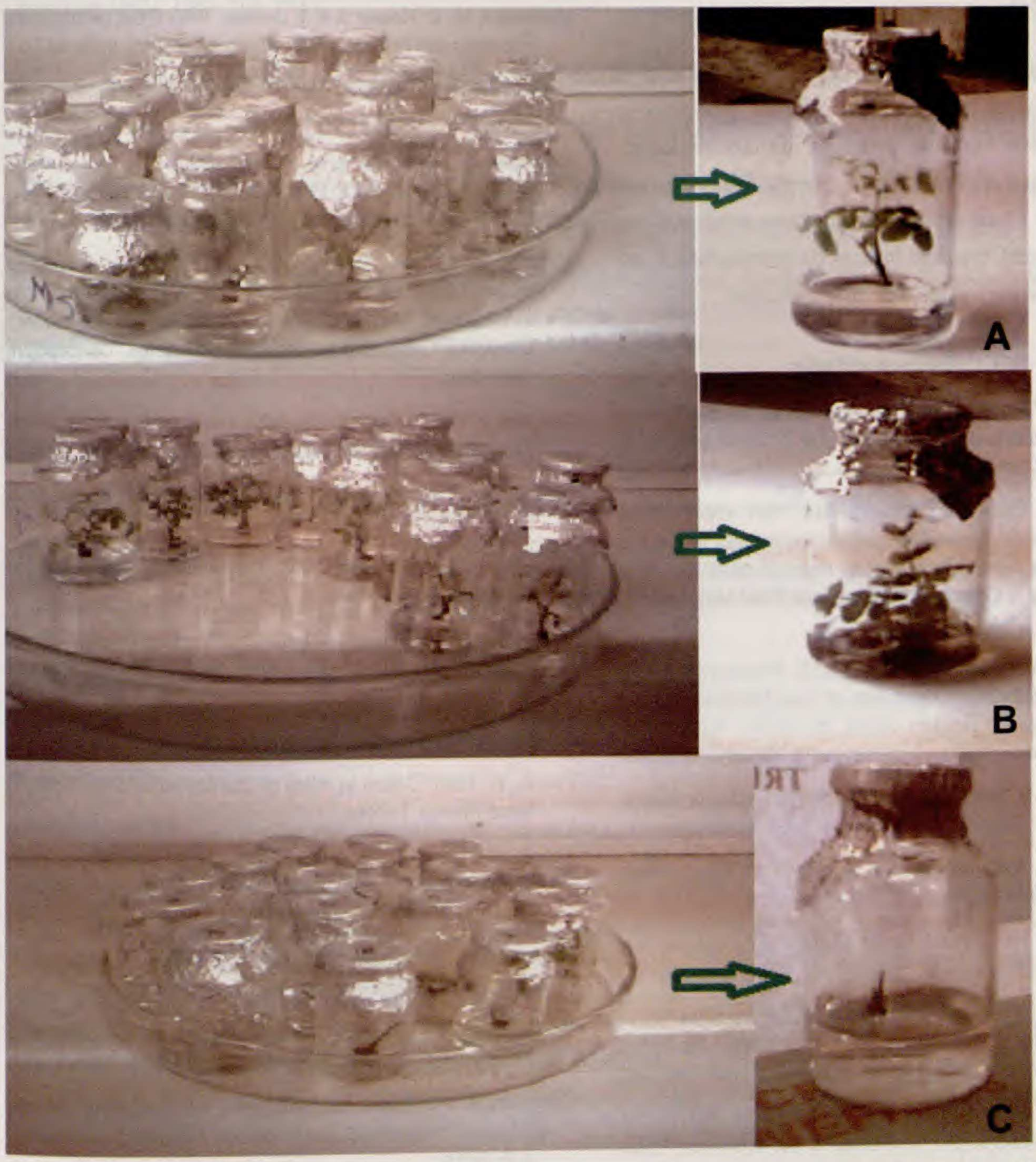

Fig. 6. Plántulas in vitro de *C. spinosa* a los 45 dias de edad, expuestas a las concentraciones de A: 0 ppm de AIA; B: 0.5 ppm de AIA y C: 1 ppm de AIA

Muchos autores señalan, que la combinación de ambos tipos de hormonas (citoquininas y auxinas) son necesarias para inducir un mayor número de brotes (Comunicación personal), por lo que discrepamos, ya que, en esta experiencia sólo se utilizó una auxina (AIA), logrando un desarrollo de los segmentos nodales.

Los resultados obtenidos, se deberían a un desencadenamiento fisiológico de la acción hormonal condicionado por la aplicación en interacción de los reguladores de crecimiento exógenos (dosificaciones de hormonas al medio). La mayoría de éstas están en pequeñas cantidades, en que los lugares de síntesis y sitios de acción generalmente son distintos, siendo, en algunos casos, activos en el mismo sitio de formación, por lo que, en general, presentan un amplio y diverso espectro de acción (Bidwell, 1990)

En general, todos los procesos de crecimiento "*in vitro*" son altamente dependiente de las interacciones de los reguladores naturales endógenos, y los análogos de los reguladores añadidos al medio, por lo tanto, el estado fisiológico del material vegetal es de mayor importancia (Aguila *et al.*,1997).

Conclusiones

Concluimos que la concentración encontrada de AIA 0.5 ppm, es la ideal para obtener plántulas *in vitro* con buena longitud y mayor número de hojas. Con esta experiencia nos va a ser posible propagar masivamente *C. spinosa*, mejorando en producción a escala comercial, creando bancos de germoplasma, así como también para planes de reforestación.

Literatura citada

Aceves, J. 1997 Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad, Ciencia Administrativa, Vol. Nueva época, Número uno.

Águila, N.; M. Cases & J. Manzanera. 1997. Efecto de los reguladores del crecimiento en la regeneración de plantas *in vitro* de *Satureja fructicosa* Reunión de la Soc. esp. Fisiol. Veg y V Cong. Luso-Espanhol de Fisiol Veg. Libro de Resúmenes C9-4.

Albarrán, J.; F. Fuenmayor & M. Fuchs. 2003, Propagación Clonal Rápida de Variedades Comerciales de Yuca Mediante Técnicas Biotecnológicas, Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela. Maracay – Venezuela

Azcon-Bieto, J. & M. Talón, 2000, fundamentos de Fisiología Vegetal. Editorial Mc. Graw – Hill Interamericana, Madrid-España.

Bartel, B. 1997. Auxin biosintesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:51-66

Bhojwani, S. 1990. Plant Tissue Cultura. Applications and Limitations. Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdan.

Brand, M, R. 1993. Agar and ammonium nitrate influence by perhyydeicity, tissue nitrate and total nitrogen contento f serviceberry (Amelanchier arborea) shoots *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 35: 203-206.

Calderon-Baltierra, X.; F. Perez & A. Rotella. 1993. Micropropagación de una especie chilena en peligro de extinción: *Gomortega keule* (Mol.) Baillon (Magnoliopsidae, Gomortegaceae). Bosque (Chile), Vol. 14, Nº 1, p. 23-28.

Castillo, P. 1973. Intervención de una citoquinina y de una auxina en la propagacion de *Pinus radiata*. Trabajo de Hablitacion para el ascenso de categoría en la Docencia Universitaria. Universidad Nacional de Trujillo. Trujilo-Perú.

De La Cruz, P. 2004. Aprovechamiento integral y racional de la tara *Caesalpinia spinosa - Caesalpinia tinctoria*. Rev. Inst. investig. Fac. minas metal cienc. geogr, jul./dic. , vol.7, no.14, p.64-73.

FAO. 1994, Dirección de Productos Forestales, Santiago – Chile.

Fitchet, P. 1990. Dimple guava established in tissue culture. Inligtings-bulletn Navorsinginstituut vir Sitrus en Subtropieses Vrugte 212: 5.

Gbhojwani, S. & M. Razdan. 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdan.

Hartmann, H.; D. Kester & F. T. Davies. 1993. Plant propagation. Principles and Practices. Fifth edition. New Delhi, India. 647 p.

Hurtado, D. & M. Merino. 1994. Cultivo de Tejidos vegetales. 3° ed. Editorial Trillas, S. A. Mexico.

Khattak, M.; M. Malik & M. Khan. 1990. Effect of surface sterilization agents on *in vitro* culture guava (*Psidium guajava* L.) cv Safeda tissue. Sarhad Jornal of Agriculture 6 (2): 151-154.

Mardones, L. 1999. Recuperación de genotipos de avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.), mediante cultivo *in vitro* de embriones. Memoria de Título. Universidad de Concepción, Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Concepción, Chile. 40 p.

Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro en meristemos y la organogénesis. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 162 p.

Messeguer, J. & E. Melé. 1987. *In Vitro* Propagation Of Adult Material and Seedlings of *Corylus avellana*. Acta Hort. (ISHS) 212:499-504

Mostacero, J. & F. Mejia. 1993. Taxonomita de Fanerógamas Peruanas, Trujillo – Perú.

Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiol. Plant.

Patten, Ch. & B. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid (review). Canadian Journal of Microbiology 42: 207-220.

Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Editorial Mund-Prensa. España.

Pierik, R. 1990. Department of Horticulture. Agricultural Univ. Wageningen. The Netherlands. Cultivo in vitro de las Plantas Superiores. Madrid: Edi Mundi Press.

Roca, W. & L . Mroginski. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Centro internacional de Agricultura Tropical. Cali. Colombia.

Rodríguez, J. 1996 II Simposio Internacional sobre Palmeras ornamentales y Monocotiledoneas tropicales. Tenerife.

Salisbury, F. & C. Ross. 1978. Plant Physiology. Second Edition. Wadsworth Publishing Company, Inc. Belmont, California, U. S. A. 422 p.

Severin, C.; D. Bruzzese; O. Di Sapio; M. Giubileo & S. Gattuso. 2005, Regeneración *in vitro* de *Aloysia citriodora* Palau (Verbenaceae) Número VIII

Soberón J.; E.Quiroga; A.Sampietro & M.Vattuone. 2005. Auxinas.Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales. Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán. Argentina.

Tacoronte, M.; M. Vielma & A. Mora. 2004. Propagación *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de yemas axilares. ACV, vol.55, no.1, p.7-12.

Ugent, D.& C.Ochoa. 2006. La Etnobotánica del Perú desde la Prehistoria al Presente, Lima – Perú.

Viloria, Z. 1993. Cultivo in vitro de nudos de guayabo (*Psidium guajava* L.). Fase I. La Universidad del Zulia. Facultad de